

31.08.2004

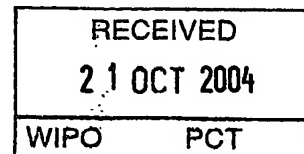
日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 8月29日
Date of Application:

出願番号 特願2003-307624
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP2003-307624]

出願人 タカラバイオ株式会社
Applicant(s):

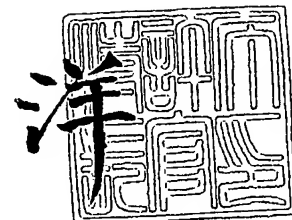


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年10月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2004-3090289

【書類名】	特許願
【整理番号】	T-1846
【提出日】	平成15年 8月29日
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	C12N 15/00
【発明者】	
【住所又は居所】	滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】	上野 高嗣
【発明者】	
【住所又は居所】	滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】	住岡 理早
【発明者】	
【住所又は居所】	滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】	小山 信人
【発明者】	
【住所又は居所】	滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】	峰野 純一
【発明者】	
【住所又は居所】	滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】	加藤 郁之進
【特許出願人】	
【識別番号】	302019245
【氏名又は名称】	タカラバイオ株式会社
【代表者】	加藤 郁之進
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	173212
【納付金額】	21,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

プロモーター配列、ポリ A シグナル配列、およびプロモーター配列とポリ A シグナル配列の間に挿入された、前記プロモーターの作用により 1 分子の RNA として転写される DNA 配列を有する DNA であって、前記 DNA 配列が下記から選択されることを特徴とする DNA;

(1) レポーター遺伝子配列に接続された所望の核酸配列を有する DNA 配列であって、当該 DNA からは、レポーター遺伝子産物が翻訳可能な形で、かつ所望の核酸配列由来の産物は実質的に翻訳されない形でコードされる mRNA が転写される DNA 配列、および

(2) レポーター遺伝子配列とこれに隣接する制限酵素認識切断部位を有する DNA 配列であって、前記制限酵素認識切断部位に所望の核酸配列が挿入された場合、当該 DNA からは、レポーター遺伝子産物が翻訳可能な形で、かつ所望の核酸配列由来の産物は実質的に翻訳されない形でコードされる mRNA が転写される DNA 配列。

【請求項 2】

レポーター遺伝子配列が所望の核酸配列もしくは制限酵素認識切断部位の上流に位置する DNA 配列が挿入された、請求項 1 記載の DNA。

【請求項 3】

レポーター遺伝子配列と所望の核酸配列もしくは制限酵素認識切断部位の間の終止コドンにより、所望の核酸配列由来の産物が実質的に翻訳されないように設計された DNA 配列が挿入された請求項 2 記載の DNA。

【請求項 4】

レポーター遺伝子配列が所望の核酸配列もしくは制限酵素認識切断部位の下流に位置する DNA 配列が挿入された、請求項 1 記載の DNA。

【請求項 5】

所望の核酸配列が開始コドンとして機能する配列を有しないことを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の DNA。

【請求項 6】

所望の核酸配列が真核細胞生物由来の配列であることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の DNA。

【請求項 7】

所望の核酸配列がウイルス由来の配列であることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の DNA。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の DNA を含有するベクター。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の DNA もしくは請求項 8 記載のベクターから転写される mRNA。

【請求項 10】

所望の遺伝子の発現を変化させる機能的ヌクレオチド分子を検索する方法であって、以下の工程、

(1) プロモーター配列、ポリ A シグナル配列、およびプロモーター配列とポリ A シグナル配列の間に挿入された、前記プロモーターの作用により 1 分子の RNA として転写される DNA 配列を有する DNA もしくは該 DNA を含有するベクターを用意し、ここで前記 DNA 配列はレポーター遺伝子配列に接続された所望の核酸配列を有する DNA 配列であって、当該 DNA からは、レポーター遺伝子産物が翻訳可能な形で、かつ所望の核酸配列由来の産物は実質的に翻訳されない形でコードされる mRNA が転写される DNA 配列である DNA であり、

(2) (1) の DNA またはベクターを用いて mRNA を転写させ、

(3) (2) の mRNA にヌクレオチド分子を接触させ、

(4) mRNA のレポーター遺伝子に相当する領域またはレポーター遺伝子産物を検出す

る、
工程を包含することを特徴とする機能的ヌクレオチド分子の検索方法。

【請求項 11】

ヌクレオチド分子によって発現が変化する遺伝子を検索する方法であって、以下の工程

(1) プロモーター配列、ポリ A シグナル配列、およびプロモーター配列とポリ A シグナル配列の間に挿入された、前記プロモーターの作用により 1 分子の RNA として転写される DNA 配列を有する DNA もしくは該 DNA を含有するベクターを用意し、ここで前記 DNA 配列はレポーター遺伝子配列に接続された所望の核酸配列を有する DNA 配列であって、当該 DNA からは、レポーター遺伝子産物が翻訳可能な形で、かつ所望の核酸配列由来の産物は実質的に翻訳されない形でコードされる mRNA が転写される DNA 配列である DNA であり、

(2) (1) の DNA またはベクターを用いて mRNA を転写させ、

(3) (2) の mRNA にヌクレオチド分子を接触させ、

(4) mRNA のレポーター遺伝子に相当する領域またはレポーター遺伝子産物を検出する、

工程を包含することを特徴とするヌクレオチド分子によって発現が変化する遺伝子の検索方法。

【請求項 12】

請求項 1～7 のいずれか 1 項記載の DNA もしくは請求項 8 記載のベクターを含有することを特徴とするキット。

【書類名】明細書

【発明の名称】機能的ヌクレオチド分子の検索方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝子の発現を効果的に抑制できる核酸の普遍的検索法に関する。さらに、該方法に使用するDNA、ベクター、該方法のためのキットに関する。

【背景技術】

【0002】

タンパク質の発現量は多様な方法で制御されている。例えば、転写因子による遺伝子からmRNAへの転写制御、mRNAからアミノ酸配列への翻訳の制御、ヌクレアーゼによるmRNA分解に対するmRNAの安定性の制御などにより、細胞は常に目的の発現量を保つよう制御している。

【0003】

タンパク質の発現量をmRNAの段階で人工的に抑制する方法として、mRNAに対するアンチセンスRNAによる抑制、リボザイムによるmRNAの分解、RNAi (RNA interference) などが挙げられる。これらの方法においては、タンパク質をコードする核酸配列、およびその周辺の核酸配列のどの領域を標的とするかにより、その抑制効果が著しく異なることが知られている（例えば、非特許文献1）。タンパク質の発現量を確認する方法として、通常、標的のタンパク質とレポータータンパク質の融合タンパク質を合成し、そのレポータータンパク質を指標にタンパク質の発現量を推測している。そして、標的のタンパク質とレポータータンパク質の融合タンパク質の全長が翻訳されているかを確認するために、標的のタンパク質の下流にレポータータンパク質を融合させる方法が通常用いられている。従って、レポーター遺伝子が翻訳可能な形で、これに隣接する標的のタンパク質をコードする核酸配列が翻訳されない形で連結されたDNAは知られていない。

【0004】

例えば、Nilssen TWらは、標的のタンパク質とその下流にレポータータンパク質を融合させた融合タンパク質を発現するDNAを構築し、レポータータンパク質の発現を調べることにより、標的の核酸配列の発現を効果的に抑制できるリボザイム等の検索を行なっている（例えば、特許文献1）。しかしながら、機能を持つ融合タンパク質を発現することは容易ではなく、融合したためにタンパク質としての機能を失うことは少なくない。従って、レポータータンパク質が検出されなかったとしても、mRNAの分解によるmRNAの不安定化によるものか、mRNAの立体構造の変化によるものか、翻訳機構の阻害によるものか、レポータータンパク質としての機能を失ったのか、さらなる詳細な検証が必要となる。このような、融合タンパク質、キメラタンパク質を生じることなく、所望の核酸配列に作用する分子の検索方法は知られていない。

【0005】

従って、より多くの核酸配列に普遍的に対応でき、mRNAの安定性を変化させることにより発現を変化させる機能的ヌクレオチド分子の検索方法が求められていた。

【0006】

【特許文献1】米国公開第2002/0002278号公報

【非特許文献1】Nature Medicine Vol. 9 No. 3 347

頁(2003)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、より多くの核酸配列に普遍的に対応できる、所望の核酸配列の発現を変化させる機能的ヌクレオチド分子の検索方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記の事情を鑑み、鋭意研究及び探索を行った結果、プロモーター、レポーター遺伝子（終始コドンを含んでいてもよい）、所望の核酸配列の部分配列（開始コドンを含んでいてもよい）、ポリAシグナルを有するDNAを構築することにより、より多くの核酸配列に普遍的に対応でき、mRNAの安定性を変化させて所望の核酸配列がコードするタンパク質の発現を変化させることができる分子を検索できることを見出した。さらに、上記のDNAがより多くの核酸配列に普遍的に対応できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、プロモーター配列、ポリAシグナル配列、およびプロモーター配列とポリAシグナル配列の間に挿入された、前記プロモーターの作用により1分子のRNAとして転写されるDNA配列を有するDNAであって、前記DNA配列が下記から選択されることを特徴とするDNAに関する。

- (1) レポーター遺伝子配列に接続された所望の核酸配列を有するDNA配列であって、当該DNAからは、レポーター遺伝子産物が翻訳可能な形で、かつ所望の核酸配列由来の産物は実質的に翻訳されない形でコードされるmRNAが転写されるDNA配列、および
- (2) レポーター遺伝子配列とこれに隣接する制限酵素認識切断部位を有するDNA配列であって、前記制限酵素認識切断部位に所望の核酸配列が挿入された場合、当該DNAからは、レポーター遺伝子産物が翻訳可能な形で、かつ所望の核酸配列由来の産物は実質的に翻訳されない形でコードされるmRNAが転写されるDNA配列。

【0010】

本発明の第1の発明において、レポーター遺伝子配列が所望の核酸配列もしくは制限酵素認識切断部位の上流に位置するDNA配列が挿入されたDNAであってもよく、この場合、レポーター遺伝子配列と所望の核酸配列もしくは制限酵素認識切断部位の間の終止コドンにより、所望の核酸配列由来の産物が実質的に翻訳されないように設計されたDNA配列が挿入されたDNAであってもよい。

【0011】

本発明の第1の発明において、レポーター遺伝子配列が所望の核酸配列もしくは制限酵素認識切断部位の下流に位置するDNA配列が挿入されたDNAであってもよく、所望の核酸配列が開始コドンとして機能する配列を有しないことを特徴とするDNAであってもよい。さらに、所望の核酸配列が真核細胞生物由来、ウイルス由来の配列であることを特徴とするDNAであってもよい。

【0012】

本発明の第2の発明は、本発明の第1の発明のDNAを含有するベクターに関する。

【0013】

本発明の第3の発明は、本発明の第1の発明のDNAもしくは本発明の第2の発明のベクターから転写されるmRNAに関する。

【0014】

本発明の第4の発明は、所望の遺伝子の発現を変化させる機能的ヌクレオチド分子を検索する方法であって、以下の工程、

- (1) プロモーター配列、ポリAシグナル配列、およびプロモーター配列とポリAシグナル配列の間に挿入された、前記プロモーターの作用により1分子のRNAとして転写されるDNA配列を有するDNAもしくは該DNAを含有するベクターを用意し、ここで前記DNA配列はレポーター遺伝子配列に接続された所望の核酸配列を有するDNA配列であって、当該DNAからは、レポーター遺伝子産物が翻訳可能な形で、かつ所望の核酸配列由来の産物は実質的に翻訳されない形でコードされるmRNAが転写されるDNA配列であるDNAであり、
- (2) (1)のDNAまたはベクターを用いてmRNAを転写させ、
- (3) (2)のmRNAにヌクレオチド分子を接触させ、
- (4) mRNAのレポーター遺伝子に相当する領域またはレポーター遺伝子産物を検出する、

レオチド分子のことをいう。機能的ヌクレオチド分子には、所望のタンパク質の発現を阻害する分子、mRNAの中の所望の核酸配列に配列特異的に作用し、最終的にmRNA全体を不安定化させる分子、mRNAの中の所望の核酸配列を配列特異的に分解し、最終的にmRNA全体を不安定化させる分子も含まれる。機能的なヌクレオチド分子は、タンパク質や糖質とともにタンパク質複合体を形成していてもよい。

【0022】

本発明において、実質的に翻訳されない形とは、理論上翻訳されることの無いように設計された形であり、翻訳された場合でもその存在が無視できる程度に微量であることを示す。ごく微量の翻訳が確認されたとしても、融合タンパク質による影響を排除できるという本発明の特徴を否定する量でなければ、実質的に翻訳されないのと同様である。

【0023】

(1) 本発明のDNA

本発明のDNAは、プロモーター配列、ポリAシグナル配列、およびプロモーター配列とポリAシグナル配列の間に挿入された、前記プロモーターの作用により1分子のRNAとして転写されるDNA配列を有するDNAであって、前記DNA配列が下記から選択されることを特徴とするDNAである。

(A) レポーター遺伝子配列に接続された所望の核酸配列を有するDNA配列であって、当該DNAからは、レポーター遺伝子産物が翻訳可能な形で、かつ所望の核酸配列由来の産物は実質的に翻訳されない形でコードされるmRNAが転写されるDNA配列、および

(B) レポーター遺伝子配列とこれに隣接する制限酵素認識切断部位を有するDNA配列であって、前記制限酵素認識切断部位に所望の核酸配列が挿入された場合、当該DNAからは、レポーター遺伝子産物が翻訳可能な形で、かつ所望の核酸配列由来の産物は実質的に翻訳されない形でコードされるmRNAが転写されるDNA配列。

【0024】

本発明のDNAにおいて、所望の核酸配列は該DNAから転写されるmRNAのUTRに存在し、翻訳されない形であるため、融合タンパク質が生じることなく、レポーター遺伝子産物（レポータータンパク質）のみが機能を保った形で発現される。前記mRNA中の所望の核酸配列領域を分解するような核酸、例えばリボザイムやsiRNAが存在すると、mRNA全体が不安定となり、この結果レポータータンパク質の発現が減少する。したがって、レポーター遺伝子のmRNAまたはレポータータンパク質の減少を追跡することにより、所望の核酸配列の発現を効果的に抑制できる分子を普遍的かつ容易に検索できる。

【0025】

所望の核酸配列は実質的に翻訳されない配列であれば、隣接するレポーター遺伝子配列の上流にあってもよく、下流にあってもよい。

【0026】

所望の核酸配列がレポーター遺伝子配列の上流にある場合、本発明のDNAは所望の核酸配列が翻訳されない配列であれば特に限定はないが、例えば翻訳の開始コドン（例えばATG）を含まないように特定の領域を選択して所望の核酸配列としても良く、開始コドンとして機能する配列があれば、塩基の置換、付加、欠失、挿入により翻訳されない配列としても良い。

【0027】

所望の核酸配列がレポーター遺伝子配列の下流にある場合、本発明のDNAは所望の核酸配列が翻訳されない配列であれば特に限定はないが、例えばレポーター遺伝子配列と所望の核酸配列の間に終止コドンを配置すれば良い。この終止コドンによりmRNAの翻訳がレポーター遺伝子でストップし、所望の核酸配列が翻訳されないため、レポータータンパク質と所望のタンパク質の融合タンパク質が生じることなく、レポータータンパク質がmRNAの安定性を反映しながら発現することが期待できる。

【0028】

本発明のDNAは、タンパク質の発現を変化させる機能的なヌクレオチド分子の検索方

法に用いることができる。

【0029】

本発明のDNAに含まれるプロモーター配列は、真核細胞内またはそれに類似した環境（例えば、無細胞タンパク質発現系）においてmRNAへの転写開始反応に関与する活性を有する配列であれば何でもよく、真核細胞生物由来のプロモーター配列（例えば、 β アクトチンプロモーター）、真核細胞内でプロモーター活性を有するウイルス由来のプロモーター配列（例えば、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター）のいずれもが使用できる。また、転写反応が行われる環境（生物個体、培養細胞、無細胞タンパク質合成系等）に応じて適切なプロモーターを選択することができる。例えば、無細胞タンパク質合成系の場合には、使用されるRNAポリメラーゼに対応するものを選択すればよく、上記真核細胞生物由来、ウイルス由来のプロモーター配列のほか、T7ファージなどのファージ由来のプロモーター配列を選択しても良い。特に限定はされないが、タンパク質の発現を抑制する機能的ヌクレオチド分子を検索する場合は、明確にその抑制の程度を判断できるように、恒常的に強く発現するプロモーターが好適に使用できる。

【0030】

本発明のDNAに含まれるレポーター遺伝子配列は、直接的及び／又は間接的に検出される任意のタンパク質をコードする遺伝子の核酸配列であれば限定は無い。レポーター遺伝子がコードするタンパク質（レポータータンパク質）としては、特に限定はされないが、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリフォスファターゼなどの特異的に検出可能な物質を生産する酵素、ならびに直接的に検出されるタンパク質が例示される。直接的にタンパク質を検出する方法としては、レポータータンパク質を認識する特異抗体の使用により検出する方法、蛍光シグナルを生じるレポータータンパク質を認識する特異抗体の使用により検出する方法、蛍光シグナルを検出する方法、及び薬剤耐性形質を付与するような選択マーカータンパク質が例示される。これらのレポータータンパク質により細胞をsortingすることができ、例えば蛍光シグナルを生じるレポータータンパク質は、そのタンパク質を発現する細胞をFACS（fluorescence activated cell sorting）法により選択することができ有用である。

【0031】

本発明のDNAに含まれる所望の核酸配列は、発現を変化させることが望まれるタンパク質の全長をコードする核酸配列であってもよく、その一部であってもよい。また、興味の対象である標的タンパク質のmRNAの3' UTR、5' UTRも所望の核酸配列として選択できる。また、所望の核酸配列は複数であってもよく、興味の対象である生物由来のゲノムライブラリー、cDNAライブラリー、特定の器官、時期で発現しているcDNAライブラリーなどから作製された核酸（群）を、所望の核酸配列としてもよい。

【0032】

本発明のDNAは、導入された宿主細胞中もしくは転写反応液中において、レポーター遺伝子配列、所望の核酸配列、ポリAシグナル配列の順、もしくは所望の核酸配列、レポーター遺伝子配列、ポリAシグナル配列の順に並んだ1分子のmRNAとして転写される。該mRNAは、機能的ヌクレオチド分子により不安定化される。例えば、機能的ヌクレオチド分子として、mRNAの所望の核酸配列領域に、その塩基配列を認識して作用し、結果的にmRNA全体を不安定化させる分子が挙げられる。例えば、RNAi機構におけるdsRNA、siRNA、shRNA、ヌクレアーゼ複合体（RISC: RNA-induced silencing complex）、生物の発生段階に関与しているとされるstRNA（small temporal RNA）、広範な生命現象に関与していると思われるmiRNA（micro RNA）、miRNAを含むタンパク質複合体miRNP、リボザイム、マキシザイム、ハンマーヘッドリボザイム、アンチセンスRNA、EGS（External Guide Sequence）、およびこれらのヌクレオチド分子を含むタンパク質複合体が例示される。

【0033】

本発明のDNAは、所望の核酸配列がタンパク質に翻訳されない形でコードされている

ので、レポータータンパク質は本発明のDNAより転写されたmRNAから単独のタンパク質として自然に近い状態で安定的に発現する。したがって、本発明のDNAを使用においては、例えば、レポータータンパク質の発現が抑制された場合、この現象が所望のタンパク質との融合タンパク質とされたためにレポータータンパク質の本来の機能に変化を生じたことに起因する現象である可能性を排除することができる。また、所望の核酸配列が翻訳されないため、機能的なヌクレオチド分子が所望の核酸配列に翻訳機構を阻害するように作用して、レポータータンパク質の本来の機能に変化を生じたことに起因する現象である可能性を排除することができる。

【0034】

【0034】
本発明においては、レポーター遺伝子配列とこれに隣接する制限酵素認識切断部位を有するDNA配列であって、前記制限酵素認識切断部位に所望の核酸配列が挿入された場合、当該DNAからは、レポーター遺伝子産物が翻訳可能な形で、かつ所望の核酸配列由来の産物は実質的に翻訳されない形でコードされるmRNAが転写されるDNA配列も本発明のDNAに含まれる。該DNAは、使用する際に目的に応じて自由に所望の核酸配列を挿入することができ有用である。制限酵素認識切断部位は、興味の対象である所望の核酸配列を挿入するのに都合のよい配列であれば何でもよい。特に限定はされないが、例えばクロニングサイト、マルチクロニングサイトと呼ばれる1つもしくは複数の制限酵素サイトが並んだ配列が挙げられ、市販のベクター、リンカーなどで広く一般に使用されている配列が好適に使用できる。

【0035】

【0035】
本発明のDNAにおいて、ポリAシグナル配列はmRNAの3'末端にポリA付加反応を生じさせる配列である。ポリAシグナル配列は、ポリA付加反応を生じさせる配列である。例えば、高等真核生物のmRNAに高度に保存されていて、通常ポリA付加部位の11～30塩基上流に存在するAAUAAA塩基配列が挙げられる。

【0036】

【0036】
本発明のDNAにおいて、ポリAシグナル配列の下流にターミネーター配列を配置してもよい。ターミネーター配列は、RNAポリメラーゼによるmRNAの転写を終結させる機能を有する配列であれば何でもよい。特に限定はされないが、高等真核生物においては、RNAポリメラーゼはターミネーター配列内の複数の部位でRNAの合成を終結する。

【0037】

【0037】
本発明のDNAに含まれるポリAシグナル配列、ターミネーター配列は、mRNAの転写反応を行う環境に合わせて適宜選択することができる。タンパク質の発現ベクターが宿主主に合わせて多数市販されており、これらのベクターを基に、又は組み合わせることにより、本発明のDNAを作成してもよい。特に限定はされないが、例えば、ウシ由来のBGH p o l y Aシグナル配列、ターミネーター配列が使用できる。

【 0 0 3 8 】

(2) 本発明のベクター

(2) 本発明のベクター
本発明のベクターは、本発明のDNAを含有するベクターであり、適当な宿主細胞中やその環境に類似した反応溶液中においてレポーター遺伝子配列、所望の核酸配列、ポリAシグナル配列を同一分子内に含有するmRNAが転写されるベクターであれば何でもよい。また、本発明のベクターを作製するために使用するベクターも、本発明のDNAを含有していれば本発明のベクターに含まれる。本発明のベクターは、自立複製しうるベクター、ウイルスベクター、宿主の染色体に組み込まれるベクター、一次的に発現するベクターのいずれであってもよい。本発明のDNAに含まれるプロモーター配列、所望の核酸配列、機能的ヌクレオチド分子に応じて、適合する種由来のベクター、宿主を選択することが好ましい。現在、多くの宿主-ベクター系が市販されており、目的に応じて適宜選択することができる。

【0039】

【0039】
(3) 本発明の機能的ヌクレオチド分子を検索する方法
本発明の機能的ヌクレオチド分子を検索する方法は、以下の工程を包含する機能的ヌク
出願特2004-3090289

レオチド分子の検索方法である。

(I) 本発明の DNA もしくはベクター、つまりプロモーター配列、ポリ A シグナル配列、およびプロモーター配列とポリ A シグナル配列の間に挿入された、前記プロモーターの作用により 1 分子の RNA として転写される DNA 配列を有する DNA もしくは該 DNA を含有するベクターを用意する。ここで前記 DNA 配列はレポーター遺伝子配列に接続された所望の核酸配列を有する DNA 配列であって、当該 DNA からは、レポーター遺伝子産物が翻訳可能な形で、かつ所望の核酸配列由来の産物は実質的に翻訳されない形でコードされる mRNA が転写される DNA 配列である。

(II) (I) の DNA もしくはベクターを用いて mRNA を転写させる。

(III) (II) の mRNA にヌクレオチド分子を接触させる。

(IV) mRNA のレポーター遺伝子領域またはレポータータンパク質を検出する。

【0040】

本発明の DNA 又は該 DNA を含有するベクターを用いてレポーター遺伝子配列、所望の核酸配列、ポリ A シグナル配列の一連の配列を含む mRNA を転写し、この mRNA とヌクレオチド分子と接触させて、レポーター遺伝子の mRNA やレポータータンパク質を検出することにより、所望のタンパク質の発現を抑制する機能的ヌクレオチド分子を検索することができる。上記 mRNA の転写、ヌクレオチド分子との接触、レポーター遺伝子の発現は、細胞内、細胞外のいずれで行われてもよく、並行して、もしくは順に行われてもよい。機能的ヌクレオチド分子を検索する方法に特に限定はないが、例えば、本発明の DNA 又は本発明のベクターと、機能的ヌクレオチド分子を宿主細胞に導入し、レポータータンパク質の発現を確認すればよい。機能的ヌクレオチド分子は、標的とする核酸配列もしくはその一部を基に化学的に合成してもよく、宿主細胞で生産されるように設計されたベクターを宿主細胞に導入して細胞中で発現した生産物であってもよい。

【0041】

宿主細胞に本発明の DNA、本発明のベクター、機能的ヌクレオチド分子、機能的オリゴヌクレオチド分子を生産しうる DNA を導入する方法は、DNA、ベクターに応じて適切な方法を選択すればよく、特に限定はされないが、物理的、化学的に直接導入してもよく、感染により導入してもよい。また、機能的ヌクレオチド分子は、ゲノムライブラリー、cDNA ライブラリー、器官時期特異的 cDNA ライブラリー由来の複数のヌクレオチドであってもよい。

【0042】

(4) 本発明のヌクレオチド分子によって発現が変化する遺伝子の検索方法
また、ゲノムライブラリー、cDNA ライブラリー、器官時期特異的 cDNA ライブラリー由来の複数の標的配列を所望の核酸配列として作製した本発明の DNA 又はベクターを用意し、複数種の所望の核酸配列を含む複数種の mRNA を転写し、該 mRNA に機能的ヌクレオチド分子を接触させ、mRNA のレポーター遺伝子領域又はレポータータンパク質を検出することにより、該機能的ヌクレオチド分子の作用を検索することもできる。この方法には、プロモーター配列、ポリ A シグナル配列、およびプロモーター配列とポリ A シグナル配列の間に挿入された、前記プロモーターの作用により 1 分子の RNA として転写される DNA 配列を有する DNA が好適に使用できる。ここで前記 DNA 配列はレポーター遺伝子配列とこれに隣接する制限酵素認識切断部位を有する DNA 配列であって、前記制限酵素認識切断部位に複数の所望の核酸配列が挿入された場合、当該 DNA からは、レポーター遺伝子産物が翻訳可能な形で、かつ所望の核酸配列由来の産物は実質的に翻訳されない形でコードされる mRNA が転写される DNA 配列である。

【0043】

(5) 本発明のキット

本発明は、前述の (3)、(4) で例示した本発明の機能的ヌクレオチド分子を検索する方法や、ヌクレオチド分子によって発現が変化する遺伝子を検索する方法に使用されるキットを提供する。1 つの実施態様において、パッケージされた形態において、前出の (1) で示した本発明の DNA、もしくは、該 DNA 中の所望の核酸配列の代わりにクロ-

ニングサイトに置き換え、使用者が好みの所望の核酸配列を挿入できるDNAを含有するキットも本発明のキットに含まれる。また本発明のキットには、指示書が含まれていてもよい。

【0044】

【0044】
上記「指示書」とは、当該キットの使用法、例えば試薬液の調製方法、推奨される反応条件等を記載した印刷物であり、パンフレットまたはリーフレット形式の取り扱い説明書のほか、キットに添付されたラベル、キットが納められたパッケージ等に記載されたものを含む。さらに、インターネットのような電子媒体を通し、開示、提供された情報も含まれる。

【0045】

【0045】
さらに、前述の(2)で示したベクターを包含したキットも本発明のキットに含まれる

【实施例】

【0046】

【実施例】
以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれら実施例に限定されるものではない。また、本明細書に記載の操作のうち、プラスミドDNAの調製、制限酵素消化などの基本的な操作については上記のモレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル第2版に記載の方法によった。さらに、以下に示す大腸菌を用いたプラスミドの構築には、特に記載のない限り大腸菌JM109を宿主として使用した。また、形質転換された大腸菌は $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンプシリンを含むLB培地（1%トリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、pH7.0）、あるいは上記培地に1.5%の寒天を加え固化させたLB-アンプシリンプレートを用いて37℃で好気的に培養した。細胞の培養は、培地としてダルベッコ改変イーグル培地（バイオウイタカ社製）に10%ウシ胎児血清（バイオウイタカ社製）を加えたものを使用し、細胞培養用シャーレ（イワキガラス社製）に接種し、37℃、5%CO₂の条件で湿潤培養インキュベーター内において行なった。キットの使用および各種機器の取り扱い は添付の操作説明書に従って行なった。

【0 0 4 7】

【0047】
実施例1 マウスFas遺伝子配列を持つ標的プラスミドの構築
プラスミドpQBI25 (Wako Chemicals USA社製) はCMVプロ
モーター、rsGFP (red shifted Green Fluorescence
Protein) 遺伝子、BGHpolyAを持ち、細胞内で効率よくrsGFPを発
現する。rsGFP遺伝子とBGHpolyAの間には制限酵素部位BamHIおよびE
coRIが存在する。マウスFas遺伝子 (GenBank Accession: M8
3649) の開始コドンの75塩基下流から終始コドンまでの配列の両端に制限酵素B
amHIおよびEcoRI cohesive末端が付加されたdsDNA (配列表の配列
番号1) をpQBI25のBamHI、EcoRIサイトに挿入することにより標的プ
ラスミドpTargetFasを構築した。標的プラスミドは細胞内でrsGFP遺伝子配
列とFas遺伝子の部分配列をもつmRNAを転写する。

【0048】

【0048】
実施例2 効果的にFas遺伝子の発現を抑制するsiRNAの検索
マウスFas遺伝子の部分配列を持つ21bpの5種のdsRNAを準備した。RNA
2-1（配列番号2）とRNA2-2（配列番号3）をアニールしてRNA2、RNA3
-1（配列番号4）とRNA3-2（配列番号5）をアニールしてRNA3、RNA4-
1（配列番号6）とRNA4-2（配列番号7）をアニールしてRNA4、RNA5-1
（配列番号8）とRNA5-2（配列番号9）をアニールしてRNA5、RNA6-1（
配列番号10）とRNA6-2（配列番号11）をアニールしてRNA6を調製した。こ
れらのdsRNAをそれぞれpTargetFasと共に293細胞（ATCC No：
CRL-1573）に導入した。遺伝子導入はリポフェクタミン2000（Invitro
gen社製）とRibojuce（タカラバイオ社製）を用いて行なった。細胞を2
出願特2004-3090289

日間培養したのち、トリプシンを用いてシャーレから剥がし、MoFlo (タカラバイオ社製) により細胞の蛍光強度を測定した。結果を図1に示す。図1は、対照としてRNAを導入しなかった細胞の蛍光強度を100とした場合の相対値を示す。RNA2とpTargetFasとを導入した細胞は最も蛍光強度が弱いことから、RNA2を効果的にFas遺伝子の発現を抑制するsiRNAであると判断した。

【0049】

実施例3 実施例2の結果の確認

実施例2で得られたsiRNAが有効である確認を次のようにして行なった。Fasを発現しているNIH3T3細胞(ATCC No:CRL-1658)にRNA2、RNA3、RNA4、RNA5、RNA6をそれぞれRibojice (タカラバイオ社製) で導入した。2日後にこれらの細胞からRNAを抽出し、リアルタイムRT-PCRにより、Fas mRNAを定量した。対照としてRNAを導入していない細胞を使用し、ハウスキーピング遺伝子GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) を用いてデータの補正を行なった。リアルタイムRT-PCRはリアルタイムRT-PCRコアキット (タカラバイオ社製)、スマートサイクラーシステム (タカラバイオ社製) を用いて行い、Fasのプライマーとして配列番号12、13のオリゴDNAを、GAPDHのプライマーとしてReal time RT-PCR primer (タカラバイオ社製) のプライマーをそれぞれ使用した。結果を図2に示す。図2は、対照としてRNAを導入しなかった細胞のmRNA量を100とした場合の相対値を示す。Fas mRNA量の減少は実施例2で得られたrsGFPの蛍光強度の減少と一致することから、本スクリーニング法が有用であることが確認できた。

【産業上の利用可能性】

【0050】

本発明により、より多くの所望の核酸配列に普遍的に対応でき、mRNAを不安定化させることにより所望の核酸配列の発現を抑制する物質の検索方法が提供された。

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1】本発明の機能的ヌクレオチド分子の検索方法による検索の結果を示す図である。

【図2】本発明の機能的ヌクレオチド分子の検索方法による検索の結果を示す図である。

【配列表フリーテキスト】

【0052】

SEQ ID NO:2: Chimeric oligonucleotide designed as RNA2-1. "nucleotides 1 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"
SEQ ID NO:3: Chimeric oligonucleotide designed as RNA2-2. "nucleotides 1 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"
SEQ ID NO:4: Chimeric oligonucleotide designed as RNA3-1. "nucleotides 1 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"
SEQ ID NO:5: Chimeric oligonucleotide designed as RNA3-2. "nucleotides 1 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"
SEQ ID NO:6: Chimeric oligonucleotide designed as RNA4-1. "nucleotides 1 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"
SEQ ID NO:7: Chimeric oligonucleotide designed as RNA4-2. "nucleotides 1 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"
SEQ ID NO:8: Chimeric oligonucleotide designed as RNA5-1. "nucleotides 1 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"
SEQ ID NO:9: Chimeric oligonucleotide designed as RNA5-2. "nucleotides 1 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:10: Chimeric oligonucleotide designed as RNA6-1. "nucleotides 1 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:11: Chimeric oligonucleotide designed as RNA6-2. "nucleotides 1 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:12: Designed PCR primer to amplify a portion of mouse Fas gene.

SEQ ID NO:13: Designed PCR primer to amplify a portion of mouse Fas gene.

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> TAKARA BIO INC.

<120> Functional nucleotide screening method.

<130> T-1846

<160> 13

<210> 1

<211> 907

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

```

tagcatctcc gagagtttaa agctgaggag gcgggttcat gaaactgata aaaactgctc 60
agaaggatta tatcaaggag gccattttg ctgtcaacca tgccaacctg gtaaaaaaaaa 120
agttgaggac tgcaaaatga atgggggttac accaacctgt gcccctgca cagaagggaa 180
ggagtacatg gacaagaacc attatgctga taaatgcaga agatgcacac tctgcgatga 240
agagcatggg ttagaagtgg aaacaaactg caccctgacc cagaatacca agtgcaagtg 300
caaaccagac ttctactgcg attctcctgg ctgtgaacac tgtgttcgct gcgcctcgtg 360
tgaacatgga acccttgagc catgcacagc aaccagcaat acaaactgca ggaaacaaag 420
tcccagaaat cgcctatggg tgttgaccat ccttgttttg ttaattccac ttgtatttat 480
atatcgaaag taccggaaaa gaaagtgtg gaaaaggaga caggatgacc ctgaatctag 540
aacctccagt cgtgaaacca taccaatgaa tgcctcaaat cttagcttga gtaatacat 600
cccgagaatt gctgaagaca tgacaatcca ggaagctaaa aaatttgctc gagaaaataa 660
catcaaggag ggcaagatag atgagatcat gcatgacagc atccaagaca cagctgagca 720
gaaagtccag ctgctcctgt gctggtacca atctcatggg aagagtgatg catatcaaga 780
ttaaatacaag ggtctcaaaa aagccgaatg tcgcagaacc ttagataaat ttcaggacat 840
ggtccagaag gaccttggaa aatcaacccc agacactgga aatgaaaatg aaggacaatg 900
tctggag

```

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide designed as RNA2-1. "nucleotides 1 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 2

gugcaagugc aaaccagact t

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide designed as RNA2-2. "nucleotides 1 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 3

gucugguuug cacuugcact t

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide designed as RNA3-1. "nucleotides 1 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 4

agccgaaugu cgcagaacct t

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide designed as RNA3-2. "nucleotides 1 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 5

gguucugcga cauucggcut t

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide designed as RNA4-1. "nucleotides 1 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 6

aagccgaaug ucgcagaact t

21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide designed as RNA4-2. "nucleotides 1 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 7
guucugcgac auucggcuut t 21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Chimeric oligonucleotide designed as RNA5-1. "nucleotides 1 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 8
ggauuauauc aaggaggcct t 21

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Chimeric oligonucleotide designed as RNA5-2. "nucleotides 1 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 9
ggccuccuug auauaacct t 21

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Chimeric oligonucleotide designed as RNA6-1. "nucleotides 1 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 10
aucgccuaug guuguugact t 21

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Chimeric oligonucleotide designed as RNA6-2. "nucleotides 1 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 11
gucaacaacc auaggcgaut t

21

<210> 12
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed PCR primer to amplify a portion of mouse Fas gene.

<400> 12
cacagttaag agttcatatc

19

<210> 13
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

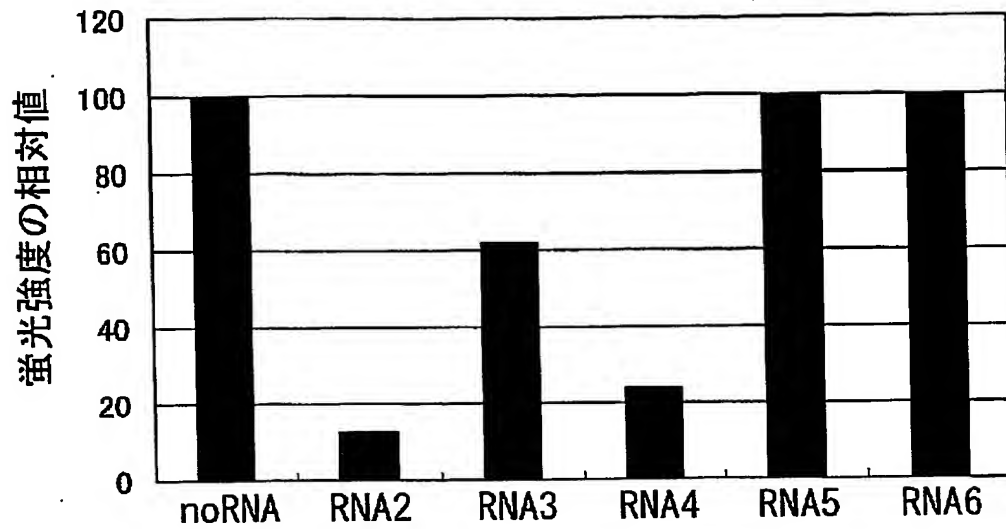
<220>
<223> Designed PCR primer to amplify a portion of mouse Fas gene.

<400> 13
tggttgctgt gcatggctc

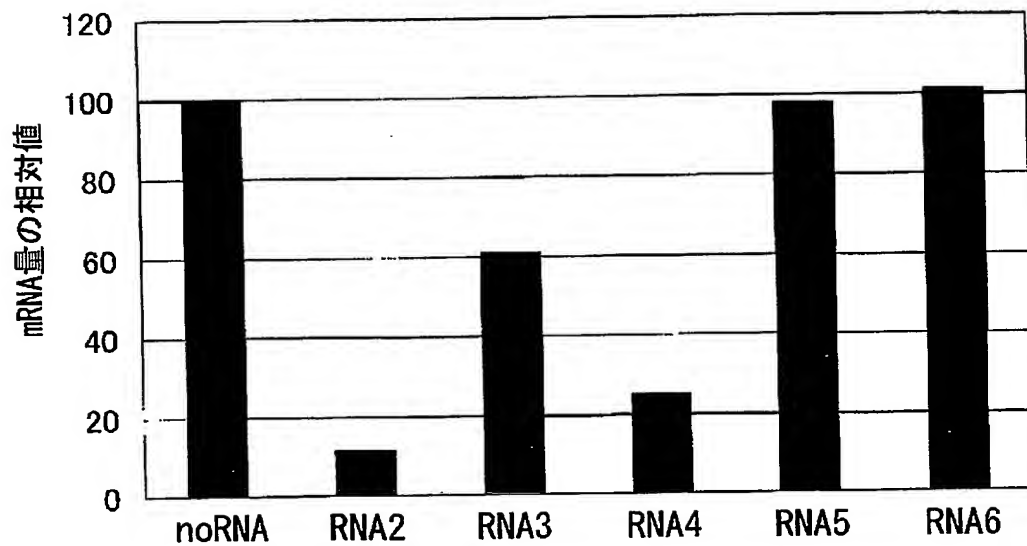
19

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】

より多くの核酸配列に普遍的に対応できる、所望の核酸配列の発現を変化させる機能的ヌクレオチド分子の検索方法を提供すること。

【解決手段】

プロモーター配列、ポリ A シグナル配列、およびプロモーター配列とポリ A シグナル配列の間に挿入された、前記プロモーターの作用により 1 分子の RNA として転写される DNA 配列を有する DNA、および、該 DNA を用いた、より多くの核酸配列に普遍的に対応でき、mRNA の安定性を変化させて所望の核酸配列がコードするタンパク質の発現を変化させることができる機能的ヌクレオチド分子の検索方法。

【選択図】

なし

特願 2003-307624

出願人履歴情報

識別番号

[302019245]

1. 変更年月日

2002年 4月 1日

[変更理由]

新規登録

住所

滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号

氏名

タカラバイオ株式会社